AMEA-nın Xəbərləri (biologiya elmləri), cild 64, №5-6, səh. 9-13 (2009)

Флавоноиды Надземной Части *Fagopyrum esculentum* Moench.

Э.Н. Новрузов[1], J. Dršata[2], Н.Ш. Мустафаев[1], А.А. Раджабов[1], З.В. Вагабов[1]
[1]*Институт Ботаники НАН Азербайджана, Бадамдарское шоссе 40, Баку AZ 1073, Азербайджан, e-mail: eldar_novruzov@yahoo.co.uk*
[2]*Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Králové, Rokitanského 62, 500 03, Hradec Králové, Czech Republic*

Исследован флавоноидный состав надземной части *F.esculentum* Moench., выращенной из семян сорта Pyra (Республика Чехия) среднеевропейского происхождения в условиях Азербайджана. Хроматографическим методом установлено, что полифенольный комплекс состоит из флавонолов, антоцианов и фенолкарбоновых кислот. Методом хроматографии выделены 5 индивидуальных флавоноидов. Физико-химическими и спектральными методами флавоноиды идентифицированы как – кверцетин, кемпферол, рутин, кверцетрин и астрагалин. Последний флавоноид в гречихе установлено впервые. Антоциан идентифицирован как цианидин-3,5-диглюкозид. Выявлено, что основным компонентом надземной части гречихи посевной являются рутин и кверцетрин.

ВВЕДЕНИЕ

Род *Fagopyrum* Mill семейства *Plygonaceae* Juss. в мировой флоре представляет 3 вида - гречиха посевная (*F.esculentum* Moench), г. татарская (*F.tataricum* (L.) Gaerth.), г. полизонтичная (*F.multiflorum* (Thumb.) Grint.). Наиболее хорошо известной как важная продовольственная культура и широко возделываемой во многих странах мира является вид *F. esculentum*. В последнее 50 лет гречиха получила значение как источник для добывания рутина - препарат витамина Р, используемого при лечении хрупкости капилляров кровеносных сосудов и многих других заболеваниях сердечно-сосудистых систем. Этот флавоноид содержится и в ряде других растений, но получение его из листьев гречихи экономически наиболее выгодно.

Изучение состава флавоноидов видов рода гречихи посвящено немного работ. В надземных органах гречихи окаймленной обнаружены рутин, кверцетин, цианидин, хлоргеновая, галловая, пирокатеховая кислоты (Гринкевич и Иванова, 1970), г. посевной – антоцианы, лейкоантоцианы, катехины, фенолкарбоновые кислоты (Troyer, 1964; Krause and Reznik, 1972), рутин, кверцетин, кверцетин-3-галактозид (Hansel and Hörhamer, 1954). В семядольных листьях обнаружен рутин, ориентин, витексин, сапонаретин, кверцетин-3-рамнозид, кверцетин-3-глюкорамнозид (Krause, 1976), в гипокотилях цианидин, рутин (Amrhein, 1979; Маргна и др., 1974). В надземных органах г. татарской найдены рутин, в плодах рутин и кверцетин (Ярош и др., 1967).

Флавоноиды кроме Р-витаминного действия обладают разнообразными лечебными свойствами: кардиотоническим (Chai et al.,1989; Cody et al., 1998), противосклеротическим (Ross, 1986), противовоспалительным, антимикробным (Leitao et al., 2005), антимутагентным (Edenharden et al., 2005), антиоксидантным (Новрузов, 1998; Kanakis et al., 2005), антивирусным (Tolkachev et al., 2003), антигликемическим (Jauaprakasam et al., 2005), интерферонным (Асадуллаев и др., 1981) и другие. Большой интерес исследователей вызывают флавоноиды в качестве перспективных противоопухолевых и радиозащитных (Cody et al., 1998; Baghci et al., 2004) средств.

По данным флоры Азербайджана (Рагимов) в Азербайджане произрастает только гречиха посевная. Однако этот вид в природе нами не найден. Продолжая изучение флавоноидсодержающих растений (Новрузов, 2005, 2010) мы исследовали состав флавоноидов *Fagopyrum esculetum* Moench впервые выращенные в Закатальском опорном пункте Института Ботаники НАН Азербайджана. Цель настоящего исследования является установление состав флавоноидов выращенные в условиях Азербайджана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили надземная часть гречихи посевной сорта Pyra (Республика Чехия) среднеевропейского происхождения.

Растение выращивали на опытном участке Закатальского опорного пункта из семян, присланных профессором Jaroslav Dršata из Республики Чехия. Образцы для анализа были собраны в фазе массовой цветения (через 50 дней после

посева).

Сумма флавоноидов была получена по описанным ранее методам (Новрузов, 2005; Новрузов и др., 2010). Флавоноиды исчерпывающе экстрагировали 85%-ным этанолом при температуре 70°С. Объединенные извлечения фильтровали и упаривали под вакуумом до водного остатка. Водный остаток последовательно обрабатывали хлороформом, эфиром и этилацетатом.

Выделенные извлечения изучали методом одно- и двумерной хроматографии на бумаге (Wathmann 3 и Filtrak FN-16) в следующих системах растворителей: 1) н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2), 2) уксусная кислота-сольная кислота-вода 15:3:82; 3) этилацетат-н-бутанол-вода (9:2:2), 4) 2%-ная уксусная кислота (для гликозидов), 5) уксусная кислота-муравьиная кислота-вода (10:2:3), 6) хлороформ-уксусная кислота (3:2) (для агликонов), 7) н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5), 8) н-бутанол-придин-вода (4:2:2) (для сахаров). Хроматограммы проявили и просматривали в видимой и УФ-свете до и после взаимодействия с парами аммиака, 5%-ным раствором хлорида алюминия в этаноле, 1%-ным раствором хлорида железа и анилинфталатом (Geissman, 1962; Бандюкова и Шинкаренко, 1972).

Индивидуальные флавоноиды получили методом препаративной хроматографии на бумаге и на колонке с полиамидным сорбентом.

Конфигурацию гликозидных связей и величины окисных циклов в углеводной части и строение флавоноидов установили по результатам кислотных, ферментативных гидролизов, щелочной деструкции гликозидов и по данным УФ и ИК-спектров (Ковалев и Литвиненко, 1965; Максютина и Литвиненко, 1968; Jurd, 1962; Mabry et al., 1970). Уф-спектры снимали на спектрофотометре “Specord”, ИК-спектры на UR-20.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате, хроматографией на бумаге в различных системах растворителей в первичного спиртового экстракта установлены наличие от 4 до 12 соединений, из которых 7 дают реакции, свойственную флавоноидам (Бандюкова и Шинкаренко, 1972). Судя по величине пятен основными соединениями надземной части гречихи являются вещества, представленные пятнами 1, 3, 5, 7 которые в УФ-свете обнаруживаются темно-коричневому свечении. При действии парами аммиака пятно 1, 3, 4, 5, 7 флюоресцируют различными оттенками желтого, а 6 тускло-красного цвета. Из-за незначительного количество вещество 6 не было получен в индивидуальном виде, но по окраске в видимой и УФ-свете, Rf-значением в различных системах растворителей с аутентичными образцами (антоцианы *Tulipa* L.) и сравнением с литературными данными (Новрузов, 2005) это вещество идентифицировано как цианидин-3,5-диглюкозид.

В результате препаративной бумажной хроматографии из эфирного извлечения выделили 2 индивидуальных вещества и условно обозначали вещества А и Б. При хроматографии на колонке полиамида из этилацетатного извлечения изолировали 3 вещества и обозначали - вещество В, Г, Д. Все вещества после трехкратной перекристаллизации (в метаноле, метанол-вода) на бумажной хроматографии в различных системах дали одну и неизменную Rf, что свидетельствует об их индивидуальности. Вещества А и Б на основании пробы по Брианту (Bryant, 1950) отнесли к агликонам, В, Г, D - к гликозидам.

Вещество А – желтые игольчатые кристаллы легко растворимы в метаноле, этаноле, слабо в эфире, нерастворимы в гексане, хлороформе и воде, Rf 0,67 (система 1) и 0,35 (система 3), т.пл. 311-312°С (в метаноле), В УФ-спектре: λ_{max}: 258, 300,370 (2.10^{-5} моль в метаноле), с добавлением CH_3COONa: 73, 375; +CH_3COONa+ H_3BO_3: 260, 385; + $AlCl_3$: 270; 420. Батохромные сдвиги с ионизирующими и комплексообразующими реагентами указывают на наличие свободных гидроксильных групп в положениях C_3 , C_5, C_7, C'_3, C'_4 (Литвиненко, Максютина, 1965). При щелочной деструкции образует флороглюцин и протокатеховую кислоту. Все эти данные позволяют идентифицировать вещество А как 3,5,7,3,4-пентагидроксифлавон (кверцетин).

Вещество Б - желтый порошок (в ацетоне), легко растворим в этаноле, метаноле, ацетоне, слабо в эфире, нерастворим в гексане. Rf 0,62 (система 1), 0,33 (система 3), с тем пл. 277-278°С, В УФ-спектре 9 (в нм): λ_{max}: 266, 322*, 366 (метаноле), +CH_3COONa: 273, 322*, 385; +CH_3COONa+H_3BO_3: 267, 320*, 365; +$AlCl_3$: 270, 305*, 350*, 424; +$AlCl_3$+HCl: 270, 305*, 347*, 424. Сдвиги, которые проявляются при добавлении ионизирующих и комплексообразующих реагентов, указывают на присутствие свободных гидроксильных групп при C_3 , C_5, C_7, и C_4 положениях (Jurd, 1962; Mabry et al., 1970). В продуктах щелочной деструкции обнаружили флороглюцин и н-оксибензойную кислоту. По данным хроматограммы, УФ, ИК-спектров, щелочной деструкции, вещества Б идентифицирован

* Здесь и далее означает плечо.

как 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавон (кемпферол).

Вещество В - желто-зеленные игольчатые кристаллы, хорошо растворимы в этаноле, метаноле, воде, слабо в бензоле, ацетоне, этилацетате, нерастворимы в эфире, хлороформе. Температура плавления 176-178° (в этаноле), Rf - 0,53 (система 1), 0,64 (система 2), 0,29 (система 4). В УФ-спектре (в нм) λ_{max}: 256, 306*, 360 (этаноле) +CH_3COONa: 267, 328*, 379; +CH_3COONa +H_3BO_3: 265, 383; +C_2H_5ONa: 273, 332*, 412; +$ZrOCl_2$: 272, 421; +$ZrOCl_2$+лимонная кислота: 263, 306*, 361. Максимумы поглощения вещества В в Уф-спектрах и их изменения при добавлении различных ионизирующих и комплексообразующих реактивов указывают на присутствие незамещенных гидроксильных групп в 5,7,3',4'-положениях (Jurd, 1962; Mabry et al., 1970). В ИК-спектра присутствуют полосы 1653, 1170, 1070 $см^{-1}$ (-CO-γ пирона флаванона связанного водородной связью с ОН-группами в положениях 3 и 5, сильная полоса 830 $см^{-1}$ указывает на замещение 1-4 в кольце Б, а 887 $см^{-1}$ замещение водородных атомов в кольце А в порядке 1,2,3,5 (Ковалев и Титов, 1966). Вещество В давало положительную цианидиновую реакцию, а образующийся при этом розовый пигмент не переходил в октанол (Bryant, 1950), что указывало на его гликозидную природу. Вещество В восстанавливало жидкость Фелинга только после кислотного гидролиза, что также свидетельствовало об его гликозидной структуре. При взаимодействии с хлоридом железа появлялось зеленое окрашивание, что указывает о наличии свободной гидроксильной группы в положении C_5 (Briggs and Locker, 1951).

Кислотный гидролиз с 5%-ной серной кислотной дал агликон, который по значением Rf, окраске пятен на хроматограммах, после проявления соответствующими проявителями совпадает с веществами А, а сахар с D-глюкозой и L-рамнозой. Температура плавления и максимумы поглощения полученного после гидролиза агликона и чистого кверцетина также указывали на их идентичность. Процентное соотношение агликона (40%) с глюконовой части гликозида указывает на то, что соединение является биозидом. При ступенчатом гидролизе в обычных условиях вещества не дают промежуточного моногликозида, это также указывает на то, что вещество В является биозидом. Последовательность присоединения углевода выяснили с помощью ферментативного гидролиза с ферментом гидролаза. При ферментативном гидролизе одновременно образуются агликон, кверцетин и биоза, соответствующая на хроматограммах рутинозе, полученной аналогичным путем из аутентичного образца рутина. Исходя из полученных данных вещество В идентифицировали как 5,7,3',4'-тетраоксифлавон-3-β-D-рутинозид (рутин).

Вещество Г - желтые игольчатые кристаллы, хорошо растворимы в этаноле, метаноле, слабо в ацетоне, бензоле, нерастворимы в гексане, хлороформе, эфире, т.пл. 182-185° (в метаноле). В УФ-спектре (в нм) λ_{max} 256, 350; +CH_3COONa: 257,380; +CH_3COONa+H_3BO_4: 256; 372; +C_2H_5ONa: 258,410; +$AlCl_3$: 258, 400. Нефлюоресциирование вещества Г в растворе уксусного ангидрида указывало на свободную гидроксильную группу у C_5 атома (Hörhammer and Müller, 1954). При цианидовой пробе розовая окраска вещества Г с добавлением двууглекислого натрия постепенно переходила в фиолетово-красную, и затем в желтую, что указывало на наличие свободной гидроксильной группы у C'_4 атома (Venkataraman, 1962). Все эти и батохромные сдвиги максимума длинноволновой полосы поглощения указывали на отсутствие замещения в C_5 , C_7 , C_3', C_4' положениях.

При гидролизе в гидролизате обнаружен агликон, который по продуктам щелочной деструкции, данным хроматографического сравнения, а также по результатом УФ- и ИК-спектров идентифицирован как кверцетин. В гидролизате после нейтрализации анионитом (ЭДП-10) в ОН форме хроматографированием на бумаге обнаружили сахар идентичный L-рамнозе.

Темное пятно флюоресценции в УФ-свете до проявления желтого - после взаимодействия с хлористым алюминием и положительная реакция на лимонно-циркониевый реактив указывает на замещенность гидроксильной группы в C_3 положении. На основании данных хроматографии, УФ-, ИК-спектров, кислотных и ферментативных гидролизов, вещество Г идентифицировано как кверцетин-3-α-L-рамнофуранозидом (кверцитрин).

Вещество D - бледно- желтый кристалл, хорошо растворим в этаноле, метаноле, слабо в ацетоне, этилацетате, нерастворим в гексане, эфире. Темп. пл. 175-177°. λ_{max} (в этаноле) 265, 350 нм. В результате кислотного гидролиза получили 64% агликона. Результаты физико-химического и спектрального исследования позволили отождествить агликон с кемпферолом (Mabry et al., 1970). При кислотном гидролизе в гидролизате обнаружили D-глюкозу. Ферментный гидролиз и ИК-спектроскопия свидетельствуют о пиранозной форме сахара и наличии В-гликозидной связи (Ковалев и Титов,1966).

Данные УФ-спектров гликозида с ионизирующими и комплексообразующими реагентами показали, что сахарный остаток в исследуемом гликозиде находится у C_3 атома агликона,

гликозид можно идентифицировать как кемпферол-3-0-β-D-глюкопиранозид.

Таким образом, установлено, что в комплекс фенольных соединений *F.esculentum* Moench, выращенной в условиях Азербайджана, состоит из флавонолов, антоцианов и фенолкарбоновых кислот. Среды флавонолов выделены и охарактеризованы кверцетин, кемпферол, и их гликозиды - рутин, кверцетрин и астрагалин. Впервые из надземной части гречихи посевной был выделен и идентифицирован кемпферол-3-β-0- глюкопиранозид (астрагалин). Основным компонентом надземной части гречихи посевной являются рутин и кверцетин, имеющий высокую Р-витаминную активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Асадуллаев Т., Лазымова З.А., Новрузов Э.Н., Ибадов О.В., Гаджиева Т.А. (1987) Индуктор интерферона. А.с. №150-6667(СССР).

Бандюкова В.А., Шинкаренко А.А. (1972) Качественный анализ флавоноидов в растительном материале при помощи хроматографии на бумаге (методические рекомендации). Пятигорск: 24 с.

Гринкевич Н.И., Иванова И.А. (1970) Гречиха окаймленная (*Fagopyrum marginatum*) - новый источник рутина. Фармация **1:** 32-36

Ковалев И.П., Литвиненко В.И. (1965) Исследование флавоноидных гликозидов. 1. Моноглюкозиды. Химия природ. соединений. **4:** 233-240.

Ковалев И.П., Титов Е.В. (1966) Инфракрасные спектры поглощения некоторых групп природных соединений. В кн.: Атлас спектров. Харьков.

Литвиненко В.И., Максютина Н.П. (1968) Спектральное исследование флавоноидов. Обнаружение свободных фенольных оксигрупп в различных положениях. Химия природ. соединений **6:** 420.

Максютина Н.П., Литвиненко В.И. (1968) Методы выделения и исследования флавоноидных соединений. В. кн.: Фенольные соединения их биологические функции М.: 5-26.

Маргна У.В., Лаапест Л., Маргна Э., Оттер М., Вайнъров Т. (1974) Влияние эндогенного на накопление флавоноидов в преростках гречихи. АН ЭССР, биол. н. **23(4):** 704-705.

Новрузов Э.Н. (1998) Антиоксидантная свойства флавоноидов сафлора. Матер. V конф. “Биоантиоксидант” М: 68-69.

Новрузов Э.Н. (2004) Флавоноиды репродуктивных органов некоторых растений флоры Азербайджана. Изв. НАН Азербайджана (сер. биол, наук) **3-4:** 11-28.

Новрузов Э.Н. (2005) Антоциан репродуктивных органов некоторых семейств флоры Азербайджана. Изв. НАН Азербайджана (сер. биол. наук) **5-6:** 23-35.

Новрузов Э.Н. (2010) Пигменты репродуктивных органов некоторых растений и их значение. Баку, Элм: 308 с.

Рагимов М.А. (1952) Род *Fagopyrum Mill.* Флора Азербайджана **III:** 181.

Ярош Н.П, Голенковекий К.П., Кротов А.С. (1967) Татарская гречиха- богатый источник биологически активных флавоноидов. Раст. ресурсы **3(1):** 40-47.

Bagchi D., Sen C., Bagchi M., Atalay M. (2004) Anti-angiogenic, antioxidant and anticarciogenic properties of a novel anthocyanin-richberry extract formula. Biochemistry (Moscow) **69(1):** 75-80.

Briggs L.H., Locker R.H. (1951) Chemistry of New Zealand *Melicope* species. J. Chem. Soc.,31-36.

Bryant E.T. (1950) A note on the differentiation between flavonoid glycosides and their aglycons J. Am. Pharm. **39:** 480.

Chai Q., Xiayan G., Jhao M. et al. (1989) The experimental studies on the cardiovascular pharmacology of seabuckthron extract from *Hippophae rhamnoides L.* Proc. Inter. Symp. on Seabuckthorn. China: 392-397.

Cody V., Middleton E., Harborne J. (1998) Plant flavonoids in biology and medicine. New-York, Liss: 87-103.

Edenharder R., von Petersdorfi J., Baucher R. (1993) Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methyl imidase (4,5-guinoline) (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. Mutat. Res. **287:** 261-274.

Geissman T.A. (1962) The chemistry of flavonoid compounds. London.

Hansel R., Hörhammer L. (1954) Phytochemisch - sistematische untersuchung über die flavonglykoside einiger *Polygonaceae*. Arch. Pharm. **287/59(4):** 189-198.

Hattori Sh. (1956) Seasonal changes in flavone and flavonone glycosides in the fruits flowers of *Panicirus trifoliata.* Sci .Proc. Roy. Dublin Soc., **27(6):** 139-144.

Hörhammer L., Müller K.H. (1954) Vorkommen von rutin in Rheim-Arten. Arch. Pharm. **278/59(3):** 126-128.

Jayprakasam B., Vareed S., Olson L., Nair M. (2005) Insulin secretion by bioactive anthosianins and anthocyanidins present in fruits. J. Agric. Food Chem. **53(1):** 28-31.

Jurd L. (1962) Spectral properties of flavonoid components. In: The chemistry of flavonoid compounds. Ed. Geismann T. Al. London.

Kanakis C., Tarantilis P., Polission M. et.al. (2005) DNA interaction with naturally occurring antioxidant flavonoids quercetin, kaempferol and delphinidin. J. Biomol, Struct. Dyn. **22(6):** 719-724.

Krause J., Reznik H. (1972) Der einfluss der Phosphat and nitratverlosung auf den Phenylpronstroff wechsel in buchweizblattern (*Fagopyrum esculentum Moench*.). Z. Pflanzenphysiol. **68(2):** 134-143.

Leitao D., Polizello A., Ito I. et al. (2005) Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. Med. Food. **8(1):** 36-40.

Mabry T.J., Markham K.R., Thomson M.B. (1970) The systematic identification of flavonoids. Berlin-Heidelberg -N.Y: 345 P.

Ross R. (1986) The pathogenesis of atherosclerosis-un update. N. Eng. J. Med. **314:** 488-500.

Sherf H., Jenk M.H. (1967) Der einfluss des Lichtes auf die flavonoidsynthese und enzyminduktion bei *Fagopyrum esculentum Moench.* Z. Pflanzenphysiol. **Bd 57(5):** 401-418.

Tolkachev o., Shipulina L. (2003) Antiviral polyphenols from seabuckthorn leaves as the source of drug Hippomarin. Proc.of 1st Cong. of USA. Berlin: 90-103

Troyer J.R. (1956) Quantative changes in buckwheat flavonoid substances during seedling development. Plant Physiol. **31(1):** 75-78.

Venkantarman K. (1959) Flavones and isoflavones. In: Fortschritte der chemie organischer naturstoffe. Wien.

E.N. Novruzov, J. Dršata, N.Ş. Mustafayev, Ə.Ə. Rəcəbov, Z.V. Vahabov

Fagopyrum esculentum Moench. Növünün Yerüstü Hissəsinin Flavonoidləri

Orta Avropa mənşəli (Çexiya Respublikası) adi qarabaşağın (*Fagopyrum esculentum Moench.*) Pyra sortunun toxumları Azərbaycan şəraitində becərilmiş və yerüstü hissəsinin flavonoid tərkibi tədqiq edilmişdir. Xromatoqrafik üsulla müəyyən edilmişdir ki, yerüstü hissənin polifenol kompleksi flavanol, antosian və fenolkarbon turşularından ibarətdir. Xromatoqrafik metodla 5 fərdi flavonoid alınmışdır. Fiziki, kimyəvi və spectral metodlarla flavonoidlər - kversetin, kempferol, rutin, kversetrin və astraqalin kimi müəyyənləşdirilmişdir. Sonuncu maddə qarabaşaqda ilk dəfə müəyyən edilmişdir. Antosian sianidin-3,5-diqlukozid kimi müəyyənləşdirilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, adi qarabaşağınn yerğstğ hissəsinin əsas komponentləri rutin və kversetrindir.

E.N. Novruzov, J. Dršata, N.Sh. Mustafayev, A.A. Rajabov, Z.V. Vakhabov

Flavonoids of Aboveground Part of the *Fagopyrum esculentum Moench.*

It were cultivated the buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) seeds of sort Pyra of Middle Europe origin (Czech Republic) in Azerbaijan condition and the flavonoid composition of their aboveground parts were studied. By the chromatographic method determined that polyphenol complex of the aboveground part contains flavonols, anthocyanins and phenol-carbon acids. 5 individual flavonoids by chromatographic methods were obtained. Flavonoids were identified as quercetin, kaempferol, rutin, quercetrin and astragalin by physical, chemical and spectral methods. The last flavonoid was firstly determined in buckwheat. Anthocyanin was identified as cyanidin-3,5-diglycoside. It was found that the main components of the aboveground part of buckwheat are rutin and quercetrin.